

Actomyosin の溶解性に対する諸種塩類の影響

II. Actomyosin の溶解性に対する Adenosine-triphosphate の影響と Superprecipitation*

若狭 智恵子

札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

The Effect of Salts upon the Solubility of Actomyosin

II. Relation Between the Effect of Adenosinetriphosphate upon the Solubility of Actomyosin and Superprecipitation

By

CHIEKO WAKASA

Department of Physiology, Sapporo University of Medicine

(Chief: Prof. T. NAGAI)

The author studied the effect of ATP upon the solubility of AM at low concentrations of KCl and pH 7.0.

The results are as follows:

- 1) Two precipitated zones appeared during the increase of concentration of ATP.
- 2) The precipitation at high concentrations of ATP goes through a clear phase and then on to superprecipitation.
- 3) The relation between ATP- and KCl concentrations, in which superprecipitation occurred, coincides perfectly with that in the high activity range of AM-ATPase.

From the results mentioned above, the author discussed the mechanism of superprecipitation.

低塩濃度下, Actomyosin (以下AM) と Adenosinetriphosphate (以下ATP) による superprecipitation (以下 superppt) は Szent-Györgyi¹⁾ により発見された。これは、AM-ATP 間の特異的反応であつて、試験管内における筋収縮現象として重要視されている。

この機構に関しては、なお定説がないが、Weber²⁾, Szent-Györgyi³⁾ は AM の等電沈澱と本質的に同じであると述べ、Morales⁴⁾ もまた同様な見解を持つている様である。しかし、永井⁵⁾, 葛西⁶⁾ は沈澱の生成過程並びに形成沈澱物の状態及び等電沈澱の比較的弱い領域で, superppt が最も強く起るといふ事実より等電沈澱とは異なるものと述べている。

著者は前報⁷⁾ において、AM 溶液の溶解性に対する諸種 chemical agent の影響を検討し、pH 7.0, 低 KCl 濃度において、それらの agent 濃度の増加にともない、AM が沈澱、溶解、沈澱及び再溶解なる 2 段沈澱現象を呈する事

を認めた。その中、特に ATP と構造上磷酸部分に共通性を有する pyrophosphate (以下 pyro) によつても 2 段沈澱現象を生じたことは、ATP によつても 2 段沈澱現象が生ずる可能性を示唆するとともに、さらにその 2 段沈澱現象と superppt との関連性をも示唆する。

そこで、著者は ATP と AM との相互反応を 2 段沈澱現象の面から検討するとともに、これと superppt との関連につき詳細に検討を加えた。

実験方法

A. 実験材料

- 1) myosin B: 前報⁷⁾ に同じ。蛋白濃度 8.2~10.5 mg/cc.
- 2) ATP: Szent-Györgyi¹⁾ の方法により犬の筋肉より抽出し、K-塩として使用した。
- 3) Buffer: pH 7.0 の Michaelis 氏 veronal acetate

* 本研究費の 1 部は昭和 30 年度文部省科学研究費 (永井) によつた。ここに深甚なる謝意を表する。

なお、本論文の要旨は第 33 回日本生理学会総会 (昭和 31 年 5 月) において発表した。

buffer を用い、pH 7.0 は glass-electrode pH-meter で測定した。なお K 濃度を低くするため buffer 中の規定された NaCl を除いた。

4) KCl: 0.2 M, 0.6 M 溶液として保存した。

実験はすべて再蒸留水を使用した。

B. 実験方法

a) myosin B: 終濃度 1.2 mg/cc になるように加える。

b) KCl: K 濃度 0.05~0.3 M にするため必要量の KCl 溶液を加えるが、特に K 濃度 0.09~0.3 M においては buffer を用いたため、buffer 中の K 濃度を考慮した。

c) ATP: 終濃度 10^{-6} ~ 10^{-2} M になるように加える。

d) 再蒸留水: 反応混液を全量 2 cc ならしめるに必要な量を加える。

実験は、試験管に KCl 溶液、再蒸留水を加え、温浴 (18~20°C) 10 分後、myosin B を加え、さらに温浴 3 分後に ATP を添加し反応を開始する。

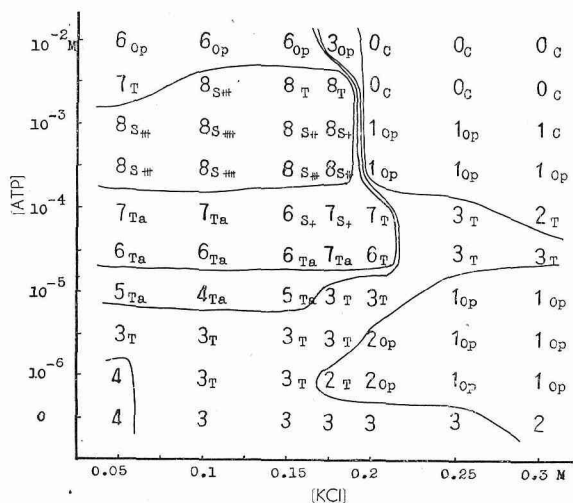
判定方法: 肉眼的判定による。即ち、先ず反応開始 6 分後に観察し、K 濃度 0.05 M, ATP 濃度 0 の場合の flock の状態及び turbidity の状態を 4 と表わし、これより溶解の悪くなるに従い、5, 6, 7, 8 とし、溶解の強い方に向うに従い 3, 2, 1, 0 とした。さらに確実を期するため 20 分後に振盪し、18~20 時間放置後再び観察を行ない K 濃度 0.05 M, ATP 濃度 0 の場合の沈澱高、compact の程度を 4 と表わし、沈澱の強くなる (compact の程度が増し、沈澱高が低くなる) に従い 5, 6, 7, 8 とし、沈澱の弱くなるに従い 3, 2, 1, 0 とし溶解度を判定した。なおこの前後 2 回のそれぞれの判定成績は互に合致した。

本実験下では superppt を生ずる。従つて上記の判定法と平行して superppt に関する判定法をも採用した。この中、syneresis を生ずる部分ではその強度に対して、麦倉⁹⁾の方法に従い判定した。即ち、反応開始 6 分後で syneresis の状態を観察し、+, ++, #, ### の段階にわけ、これ等をそれぞれ S+~S### の如く表わし、また syneresis を生じない部分については、Spicer¹⁰⁾に従い、その状態より、Ta: aggregation の状態、T: fine turbidity, Op: opalescent, C: clear 等に分け表現し、上記の溶解度の成績に併記した。

実験成績

上記の方法で実験を行い、Fig. 1, Photo. I 及び Photo. II に示せる成績を得た。実験はそれぞれ異なる家兎より抽出せる sample 3 例について行い、すべて同様の成績を示した。ここにあげた成績はその代表的なものである。

この Fig. 1 及び Photo. I (反応開始 18 時間後) に明かなる如く、K 濃度 0.05 M, ATP 濃度 10^{-6} M の部位と、K



The number indicates grade of precipitation.

pH: 7.0 (veronal acetate buffer)

Temperature: 18~20°C

Protein concentration: 1.2 mg/cc

S: Syneresis

Ta: Aspect of Aggregation

T: Fine Turbidity

Op: Opalescent

C: Clear

Fig. 1. Precipitation grade of AM-solution caused by ATP and KCl.

濃度 0.05~0.2 M, ATP 濃度 10^{-5} ~ 10^{-2} M の広い部位との 2 箇所に溶解性の悪い部分、或は沈澱帯形成部分がある。また Fig. 1 の右上側、即ち、高 ATP 濃度、高 K 濃度において AM は最も強い溶解性を示している。

以上の如く、前報⁷⁾に示した種々の chemical agent による 2 段沈澱は ATP によつても生ずることが解る。しかし、高 ATP 濃度側の沈澱帯においては、ATP 添加により clear phase を経過し、また一定の ATP 濃度、K 濃度条件により superppt を生ずることは注意する必要がある。この superppt に関しては、Fig. 1 並びに Photo. II (反応開始 20 分後) に示してある。これ等に見る如く、K 濃度が高くなるに従い、superppt を起すに必要な ATP 濃度は低くなる。また Fig. 1, Photo. I 及び Photo. II より明かなる如く、superppt は高 ATP 濃度側の広い沈澱帯の部位に一致して生じ、syneresis の強さとその振盪後の沈澱の高さ或は compact の程度は互に平行関係にある。

以上の成績より、次の如く総括することが出来る。

1. 低 K 濃度、pH 7.0 において AM は ATP 濃度に関し 2 つの沈澱帯を形成する。即ち、一見するところ、前報⁷⁾で述べた如き 2 段沈澱現象が認められる。

2. 上記 2 つの沈澱帯の中、高 ATP 濃度側のものは ATP による沈澱に当つて、clear phase を経過し、また superppt を生ずる。

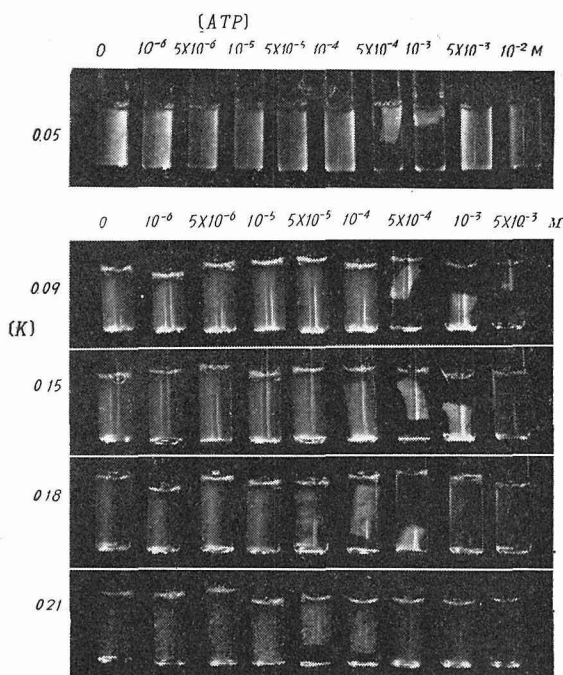


Photo. II. 20 minutes after reaction

考 按

AM の ATP による溶解性に関する上述の成績より ATP 濃度に関し 2 つの沈澱帯を形成することが明らかになった。かくの如く 2 つの沈澱帯が形成されるということそれ自身並びにその形成条件及び沈澱帯の範囲等より、この沈澱現象は、前報⁷⁾の種々の chemical agent による 2 段沈澱現象と同様であると考えられるが、先ずこれに関連せる 2, 3 の data との対応について考察を試みる。

Sarkar¹⁰⁾ は種々の pH, 種々の KCl 濃度につき AM の等電沈澱並びに superppt (ATP 0.03%) を検討した。この結果、pH 変化及び KCl 濃度に関しては、沈澱帯の広さ或は位置については、等電沈澱及び superppt 間に何等相異なく、ただ superppt は沈澱が一層強度になったにすぎないと述べている。なおまた、Sarkar¹⁰⁾ の一定 ATP 濃度 (0.02%) で、種々 KCl 濃度下における myosin の等電点のずれの data 及び Borbiero¹¹⁾ の ATP 濃度変化による myosin の turbidity に関する data がある。これ等の data によれば、myosin は pH 7.0 において、ATP 添加により沈澱を生ずることは示されていない。これ等の data は myosin を対象としている点で、本成績と直接比較することは困難であるが、AM の溶解性は myosin と殆ど同様である

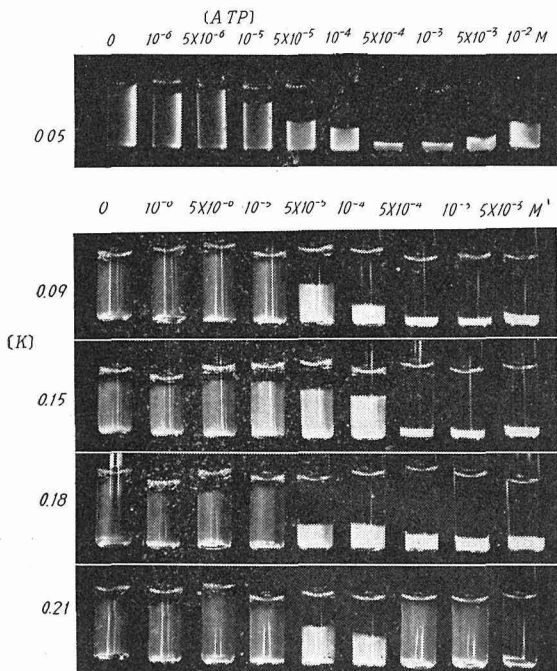


Photo. I. 18 hours after reaction

ことより^{3), 10)}、一応以上の如き比較考察も可能であると考える。以上、一見したところ、先人の何れの data からも、本成績における如き ATP 濃度変化による AM の 2 段沈澱形成の事実は予想し難い。しかしながら、従来の data は、むしろ pH 変化に重点がおかれているものが多く、何れも K 濃度及び ATP 濃度が一定か、或は比較的低濃度範囲に限られている。従つて、従来の data は著者の data の一部分を見ていたものと考えることが出来る。即ち、前報⁷⁾に示した如く、KCl 及び MgCl₂ による AM の 1 段或は 2 段沈澱に対しては、KCl 及び MgCl₂ による myosin の等電点の変化に関する Sarkar¹⁰⁾ の data より説明された。ATP による 2 段沈澱に対しても、この点を考慮するならば、Fig. 1 において、ATP 濃度に関する pH 変化を想像することが出来、これより ATP 濃度、K 濃度及び pH 変化に関する AM の沈澱曲面* が想像される。これにより、先人の data は容易に説明することが出来る。従つて、先人の data と著者の data は本質的に矛盾するものでないと考えられる。

以上、要するに著者の示した ATP による AM の 2 段沈澱現象は、従来報告された ATP の AM に対する沈澱及び溶解作用について、より広い立場から把握したものと云い得る。

* 沈澱曲面については、別報で詳細に述べる予定である。

次に superppt の機構に関連して, superppt と 2 段沈澱との関係につき, 少し考察を試みる。この点に関し, 最も興味あり且つ重要と考えられるものに pyro による AM の 2 段沈澱現象がある。pyro は緒論においてふれた如く, ATP と構造上, 特に磷酸部分に共通性を有し, また AM に対する作用においても一部において類似している salt である。従つて, pyro の 2 段沈澱と ATP のそれを比較することによつて, ATP の沈澱作用と superppt の関係を理解することが出来ると考え得る。従来, 当教室⁵⁾においては, ATP は単なる ion 作用としての plasticizing action (static action) と ATP に特異的であり且つ常にその分解を伴う contracting action (dynamic action) の二重作用を有し, この 2 つの作用は, 多かれ少なかれ同時に相伴なっているものであり, 条件によつて, 一方が強く表われるものと考えられている。従つて, ATP の 2 段沈澱について pyro のそれと比較するにあたり, 特に ATP の二重作用を考慮せねばならない。

これ等の観点より, ATP による 2 段沈澱と pyro のそれを比較検討するに, 先ず, 低 ATP 濃度側の沈澱帯と低 pyro 濃度側における沈澱帯の間には殆ど差がない。即ち, 沈澱の性質については, 両者殆ど同様で単なる沈澱にすぎず, 高 ATP 濃度側のそれに見られる如き superppt を生ずることはない。このことから低 ATP 濃度側の沈澱は pyro と本質的に同様な沈澱形成機構によるものと考えられる。しかして, 両沈澱帯及び溶解部位の濃度関係をみるに, 低 ATP 濃度側の沈澱帯は, pyro の沈澱帯に比べて狭く, 恰も pyro のそれを低 KCl 濃度側にずらしたと等しい関係にある。また ATP と pyro のそれぞれ同濃度での溶解部位においては, ATP の方が遙に強い溶解性を示している。従つて, このことは溶解作用或は plasticizing action は pyro より ATP の方が強いことに因ると考えられ, これはまた従来¹²⁾の知見と全く一致する。

次に, 高 ATP 濃度側の沈澱帯と高 pyro 濃度側の沈澱帯との間においては, それぞれ 10^{-3} M の濃度に相当して沈澱の最も強い部分があり, 沈澱部位に関しては両者全く一致している。しかし, 両沈澱帯の間には, 沈澱度についてかなりの差があり, ATP の方が pyro に比べて遙に強い。また性質についても相異がある。即ち, 高 ATP 濃度側の沈澱は, その沈澱形成過程において superppt を生ずるが, pyro においては, superppt を生ずることはない。これ等の事実より, 高 ATP 濃度側の沈澱は pyro による沈澱形成機構とは異なつた機構によるものであらうと考えられる。

この点に関し, 注目すべきことは, superppt 生起部位と ATPase 活性部位との密接な相関である。

従来, AM-ATPase に関しては, KCl 濃度に関する湯田坂¹³⁾の data 及び ATP 濃度に関する Weber¹⁴⁾の data がある。湯田坂は, AM-ATPase 活性の頂点は低 KCl 濃度側 ($0.05 \sim 0.1$ M) にあり, それより KCl 濃度が減少または増加しても次第にその活性は減少することを認め, また Weber は ATP 濃度に関して 10^{-3} M ATP に活性の頂点があり, それより低濃度または高濃度において活性は減少することを示している。これ等のことは, Fig. 1 において, superppt の生ずる K 濃度, ATP 濃度条件が, AM-ATPase 活性の高い部分の濃度条件と全く一致していることを示す。さらに湯田坂¹³⁾は低温下では superppt に特徴的な syneresis が生ぜず, 単に沈澱のみが生ずるにすぎないと述べ, このことに関しても ATPase に関連して論じられている。

これ等の事実より, superppt の生起に関しては, AM-ATPase 活性が重要な factor をなしていることが示唆される。また, 前述の低 ATP 濃度側の沈澱帯についても, その ATP 濃度においては ATPase 活性が低く, 従つて ATP は主として plasticizer として作用していると考えられる⁵⁾。従つてこの部位においては, ATP は pyro と本質的に同様に作用すると考えられ, この点前記の考察を裏づけるとともに, 更にこのことは, superppt と ATPase 活性の関係を一層強調せしめるものとする。

以上要するに superppt の機構に関しては, ATP の plasticizer としての作用による, 換言すれば, pyro 的作用による 2 段沈澱現象と, その分解を伴う contracting action との密接な関連において論ぜられるべきことが強調される。

従来, 等電沈澱と superppt との関連性に対し Weber²⁾, Szent-Györgyi³⁾ は等電沈澱と superppt は本質的に変りなく, ATP は AM の等電沈澱を強化するにすぎないという見解を述べ, また Morales¹⁾ も同様な見解を持つているようである。これに反し, 永井⁵⁾, 葛西⁶⁾ は superppt は等電沈澱とは異なる機構によるという見解を述べている。本成績によれば, superppt の生起部位は, 高 pyro 濃度側の沈澱形成部位と大体一致している。即ちこの ATP による 2 段沈澱は, 上述の如く pyro 等の等電沈澱と部位的に同一であると考えることが出来, 従つて一見 Weber²⁾, Szent-Györgyi³⁾ の見解を裏付けるかに見える。しかしながら, 若し, この考察が妥当であるとすれば, 低 ATP 濃度側の沈澱形成部位においても, superppt が生ずべきであろう。しかるに高 ATP 濃度側の沈澱部位においてのみ superppt が生ずることは, 前述の考察より, superppt の生起条件として, AM の等電沈澱の上にさらに ATP の contracting action が関与しているためと考えられる。換言すれば, 等電沈澱は superppt の生起に必要な前提条件

であるが、十分条件ではないということが出来る。従つて、本成績からは、superppt を単に等電沈澱と本質的に変りないと述べている Weber²⁾, Szent-Györgyi³⁾ の見解を支持することは出来ない。

次に、本実験における superppt を先人のものと 2, 3 比較するならば、Fig. 1, Photo. II に認められる如く、superppt を生ずる K 濃度は ATP 濃度に関係し、ATP 濃度が高い程 superppt の K 濃度 range は狭くなり、また K 濃度が高くなるにつれて、superppt を起すに必要な ATP 濃度は低くなる傾向にある。この成績は、Szent-Györgyi^{1), 3)} の成績と全く一致している。

また葛西⁶⁾ は superppt の強度に関し、superppt は等電沈澱の比較的弱い所で最も強いことを認めた。この関係は著者の data においても認められ、葛西の data と一致する。しかし、詳細に K 濃度に関してみれば、著者の data は、葛西の data よりも多少現象が K 濃度の低い方にずれている。このことは、sample (葛西：4 回洗滌, pH 7.5) 等の実験条件の差によるものと考えられる。

摘 要

低塩濃度下、pH 7.0 において、ATP による AM の沈澱並びに溶解性を検討し、次の如き成績を得た。

1. AM は ATP 濃度増加に伴ない沈澱、溶解、沈澱及び再溶解を呈した。この現象は他の種々の chemical agent による AM の沈澱現象と 2 段沈澱という点においては差がない。

2. 2 つの沈澱帯の中、高 ATP 濃度側における沈澱帯は、その沈澱過程において clear phase を経過し、さらに、superppt を生ずる。この superppt 生起部位はまた AM-ATPase 活性の最も強い部位と完全に一致している。

3. Superppt の機構に関しては、沈澱現象及び AM-ATPase 活性との関連において論ぜられるべきことを指摘した。

(昭和 31. 6. 27 受付)

文 献

- 1) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction, 1st ed. Acad. press (New York 1947).
- 2) Weber, H. H.: cit. 3) Szent-Györgyi, A. (1951).
- 3) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction, 2nd ed. Acad. press (New York 1951).
- 4) Morales, M. F.: Physiol. Rev. 35, 475 (1955).
- 5) 永井: 筋収縮の物理化学 医学書院 (1956).
- 6) 葛西: 札幌医誌 9, 146 (1956).
- 7) 若狹: 札幌医誌 9, 282 (1956).
- 8) 麦倉: 札幌医誌 5, 175 (1954).
- 9) Spicer, S. S.: Am. J. Physiol. 172, 671 (1953).
- 10) Sarkar, N. K.: Enzymologia 14, 239 (1950).
- 11) Borbiri, M.: cit. 3) Szent-Györgyi, A. (1951).
- 12) Weber, H. H. & Portzehl, H.: Adv. Prot. Chem. 7, 189 (1952).
- 13) 湯田坂: 札幌医誌 5, 90 (1954).
- 14) Weber, H. H.: Ergeb. Physiol. 47, 370 (1952).
- 15) 湯田坂: 生体の科学 7, 161 (1955).